

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0095249 (43) 공개일자 2016년08월11일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 38/16 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01) A23L 1/305 (2006.01)	(71) 출원인 부경대학교 산학협력단 부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)	
(52) CPC특허분류 A61K 38/16 (2013.01) A23L 1/3002 (2013.01)	(72) 발명자 남택정 부산광역시 남구 고동골로 91-2 (문현동) 최윤희 부산시 동래구 온천장로 20, 신화타워아파트 606 호	
(21) 출원번호 10-2015-0015990 (22) 출원일자 2015년02월02일 심사청구일자 2015년02월02일	(74) 대리인 김순웅	

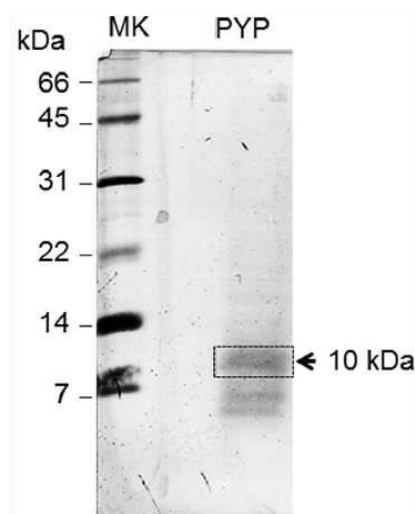
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 김으로부터 분리된 펩타이드를 포함하는 아세트아미노펜 유발성 간 손상 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 김으로부터 분리된 단백질 유래 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 아세트아미노펜 유발성 간 손상 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 구성된 펩타이드는 일반적으로 열에 약한 단백질과 달리 열과 건조에 강하며, 아세트아미노펜에 의해 유발된 간 조직의 산화적 손상과 간세포의 세포사멸을 저해하는 효과가 우수하므로, 이를 간 손상의 예방 또는 치료에 유용하게 이용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23L 1/3053 (2013.01)

A61K 38/168 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012R1A6A1028677

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 대학중점연구소지원사업

연구과제명 해산식물 유래 항노화 소재 개발 및 분자 작용 메커니즘

기 여 율 1/1

주관기관 부경대학교 산학협력단

연구기간 2012.09.01 ~ 2015.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 구성된 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 아세트아미노펜 유발성 간 손상 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 펩타이드는 김 추출물로부터 분리된 단백질의 N-말단 부위인 것을 특징으로 하는, 아세트아미노펜 유발성 간 손상 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 김은 방사무늬 김(*Pyropia yezoensis*)인 것을 특징으로 하는, 아세트아미노펜 유발성 간 손상 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 김 추출물로부터 분리된 단백질은 분자량이 10 kDa인 것을 특징으로 하는, 아세트아미노펜 유발성 간 손상 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 김 추출물로부터 분리된 단백질은

- (a) 김 분말을 물로 추출한 후 감압하여 여과하는 단계; 및
- (b) 상기 (a) 단계에서 여과한 물질에 에탄올을 가한 후 상층액을 분리하여 감압농축하는 단계;를 거쳐 분리된 것을 특징으로 하는, 아세트아미노펜 유발성 간 손상 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 (a) 단계의 추출은 20~30℃에서 수행되는 것을 특징으로 하는, 아세트아미노펜 유발성 간 손상 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 간 손상은 간염, 간경변 및 간암으로 구성되는 군으로부터 선택된 1종 이상의 간 질환을 포함하는 것을 특징으로 하는, 아세트아미노펜 유발성 간 손상 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 구성된 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 아세트아미노펜 유발성 간 손상 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 펩타이드는 김 추출물로부터 분리된 단백질의 N-말단 부위인 것을 특징으로 하는, 아세트아미노펜 유발성 간 손상 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 김으로부터 분리된 단백질 유래 펩타이드를 포함하는 아세트아미노펜 유발성 간 손상 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 아세트아미노펜(Acetaminophen, AAP)은 가장 많이 사용되고 있는 항염증치료제로, 과량 복용시 심각한 간 손상을 야기하게 된다. 실제로 미국과 영국에서는 약물에 의한 간질환 원인 중에서 가장 우위를 차지하고 있는 것이 AAP에 의한 간 손상이라고 한다. 따라서, AAP에 의해 야기되는 간 손상 메커니즘을 규명하고, 간 손상을 예방, 혹은 회복하기 위한 여러 연구들이 진행되어 왔다. Cathleen 등(TOXICOLOGICAL SCIENCES 84, 201-208, 2005)은 마우스에 AAP 투여시의 세포사멸현상중 하나인 PARP 활성이 나타난다고 보고하였으며, Tamara 등(TOXICOLOGICAL SCIENCES 76, 229-236, 2003)은 AAP가 간의 지질과산화물을 일으켜 간 손상을 야기한다고 보고하였다.
- [0003] 이에, 미국식품의약국(FDA)은 2009년 아세트아미노펜 제제가 간 손상을 초래할 수 있는 잠재적 위험에 대한 경고를 제품 라벨에 포함하도록 결정하였으며, 전문가그룹의 보고서에서 과다복용을 방지하기 위한 조치로 일반의약품에서 의사의 처방이 필요한 전문의약품으로 전환할 것과 성인 1회 섭취량을 현행 1g에서 0.65g으로 줄일 것, 하루 최대 섭취량 기준을 현행 4g에서 3.25g으로 강화할 것, 제품 라벨에 간부전 등 간의 부작용을 알리는 강한 경고 문구를 넣을 것 등을 권고하였다.
- [0004] 상기와 같은 간 손상을 예방 및 치료하기 위한 연구가 진행되었으나, 현재까지 간 손상을 치료하기 위한 적절한 천연재료 치료제가 개발되어 있지 않다. 최근 소비자들은 웰빙, 자연건강식품에 대한 요구가 증가하는 추세이나 한정적인 소재로 인한 어려움이 있으므로 기존의 제품들과 차별성을 가진 천연재료 소재의 개발이 필요한 실정이다.
- [0005] 한편, 홍조류는 다른 조류보다 비교적 깊은 물에 서식하고, 크기가 비교적 작으며, 종류는 4000여 종으로 매우 다양하며 녹조류, 갈조류보다 서식 범위가 넓어 얕은 수심에서부터 광선이 닿는 깊은 수심에까지 자생한다. 현재 홍조류의 다양한 생리화학적 효과가 검증되면서 관심이 고조됨에 따라 암세포성장 저해효과 뿐만 아니라, 혈중 지질대사 개선 효과 등이 보고되었다.
- [0006] 일명 해태(海苔)라고도 불리는 김은 홍조류의 일종으로 길이 14~25cm, 나비 5~12cm의 긴 타원모양 또는 줄처럼 생긴 달걀모양을 하고 있다. 김의 종류로는 참김(Porphyra tenera), 방사무늬 돌김(P.yezoensis), 둥근 돌김(P. suborbiculata) 등이 있으며, 그중 우리나라에서 양식하는 김의 주종을 이루는 것이 방사무늬 돌김이다. 김에는 특히, 칼슘과 인이 풍부하게 함유되어 있으며, 그중에서도 김에 함유되어있는 다당류인 포피란이 항암, 항바이러스, 항응고작용 등의 생리효과를 가진다는 사실이 밝혀지면서 김의 생리활성물질 탐색에 많은 관심이 모아지고 있다. 뿐만 아니라 김에는 항산화물질인 폴리페놀이 함유되어 있으며, Han 등(J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 33, 324-330, 2004)은 김추출물이 콜라겐 합성 및 성숙가교인 피리디놀린(pyridinolone) 생성을 회복시킨다고 하였고, 그 외에 Yashizawa 등(Bioscience Biotechnology and Biochemistry 59, 1862-1866, 1995)은 김으로부터 추출한 다당류가 대식세포 촉진작용을 나타낸다고 하였다.
- [0007] 이에 본 발명자들은 새로운 간 보호 기능성 소재 개발을 위하여 김에 대해서 연구를 수행한 결과, 분자량이 10 kDa 단백질을 동정 및 이의 구조를 분석하고, 이의 N-말단 부위 펩타이드를 분리하였으며, 분리한 펩타이드가 간 손상 치료 효과가 우수함을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 목적은 김으로부터 분리된 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 아세트아미노펜 유발성 간 손상 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 구성된 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 아세트아미노펜 유발성 간 손상 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0010] 본 발명에 따른 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 구성된 펩타이드는 일반적으로 열에 약한 단백질과 달리 열과 건조에 강하며, 아세트아미노펜에 의해 유발된 간 조직의 산화적 손상과 간세포의 세포사멸을 저해하는 효과가 우수하므로, 이를 간 손상의 예방 또는 치료에 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0011] 도 1은 SDS PAGE 및 쿠마시 브릴런트 블루(Coomassie Brilliant Blue) G-250으로 염색을 통해 본 발명에 따른 김으로부터 분리한 단백질의 분자량을 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 2는 본 발명에 따른 김으로부터 분리한 단백질의 N-말단 부위 서열의 다중서열정렬(Multiple sequence alignment)을 나타낸 도이다.
- 도 3은 본 발명에 따른 김으로부터 분리한 단백질의 N-말단 펩타이드(PYP1(1-20))를 합성한 후, 220 nm 자외선 검출을 통해 이를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 4A는 본 발명에 따른 김으로부터 분리한 단백질의 N-말단 펩타이드(PYP1(1-20)) 처리시 간세포 증식에 미치는 영향을 관찰한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 4B는 본 발명에 따른 김으로부터 분리한 단백질의 N-말단 펩타이드(PYP1(1-20)) 및 아세트아미노펜을 함께 처리한 경우 간세포 증식에 미치는 영향을 관찰한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 구성된 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 아세트아미노펜 유발성 간 손상 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0013] 상기 조성물은 약학적 조성물 및 식품 조성물을 포함한다.
- [0014] 본 발명의 펩타이드는 하기와 같은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 구성되었으며, 이를 PYP1(1-20)으로 명명하였다.
- [0015] Ala-Leu-Glu-Gly-Gly-Lys-Ser-Ser-Gly-Gly-Gly-Glu-Ala-Thr-Arg-Asp-Pro-Glu-Pro-Thr
- [0016] 본 발명의 펩타이드는 김 추출물로부터 분리된 단백질의 N-말단 부위이다.
- [0017] 상기 김은 홍조류의 일종으로서 바람직하게는 방사무늬 김(*porphyra yezoensis*)일 수 있다.
- [0018] 상기 김 추출물로부터 분리된 단백질은 분자량이 10kDa이며, 상기 분자량은 SDS-PAGE(Sodiumdodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 통해 측정하였다.
- [0019] 상기 김 추출물로부터 분리된 단백질은 당해 기술분야에서 통상적인 방법에 따라 김으로부터 추출 및 분리될 수 있으며, 본 발명에서는 하기 단계를 거쳐 분리하였다.
- [0020] (a) 김 분말을 물로 추출한 후 감압하여 여과하는 단계; 및
- [0021] (b) 상기 (a) 단계에서 여과한 물질에 에탄올을 가한 후 상층액을 분리하여 감압농축하는 단계;
- [0022] 상기 (a) 단계의 추출은 20~30℃에서 수행될 수 있으며, 바람직하게는 25℃일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 간 손상은 간염, 간경변 및 간암을 포함하는 간 질환을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0024] 또한, 본 발명의 조성물은 김 추출물로부터 분리된 단백질 유래 펩타이드인 PYP1(1-20)과 함께 간 손상의 예방 또는 치료 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등 경구 투여용 제형, 멸균 주사용액, 좌제 및 경피 투여용 제제로 제형화하여 사용될 수 있다. 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 필요에 따라 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제형화한다.
- [0026] 본 발명의 약학적 조성물을 경구 투여용 고상 제제로 제형화할 경우, 경구 투여를 위한 고상 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되는데, 이러한 고상 제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘 카르보네이트, 수크로오스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 혼합하여 제형화된다. 또한, 단순

한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물을 경구 투여용 액상 제제로 제형화할 수도 있다. 경구 투여를 위한 액상 제제는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 이러한 액상 제제에는 통상적으로 사용되는 불활성 희석제 (예를 들면, 정제수, GaIN/LPS, 리퀴드 파라핀) 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 비경구, 바람직하게는 복강내 투여를 위한 제제로 제형화될 수도 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 멸균된 수용액으로는 한스 용액 (Hank's solution), 링거 용액 (Ringer's solution) 또는 물리적으로 완충된 염수와 같은 적절한 완충용액을 이용할 수 있으며, 비수성용제로, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 이용될 수 있다. 필요에 따라 방부제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제를 이용할 수도 있다. 한편, 좌제의 경우에는 이의 통상적인 기제인 위텡솔 (witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로세라틴 등이 사용될 수 있다.

[0027] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다. 상기와 같은 방법으로 제형화된 조성물은 유효량으로 비경구 또는 경구 (경피, 피하, 정맥, 근육, 복강등)를 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있다. 상기에서 "유효량"이란 환자에게 투여하였을 때, 예방 또는 치료 효과를 나타내는 양을 말한다. 본 발명에 따른 조성물의 투여량은 투여 경로, 투여 대상, 연령, 성별, 체중, 개인차 및 질병 상태에 따라 적절히 선택될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있으나, 바람직하게는 0.1~10000 mg/체중kg/day, 보다 바람직하게는 10~1000mg/체중kg/day의 유효량으로 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물은 간 손상의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0028] 본 발명의 조성물은 간 손상의 예방 또는 개선을 목적으로 건강기능식품에 첨가될 수 있다. 본 발명의 김 추출물로부터 분리된 단백질 유래 펩타이드인 PYP(1-20)을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 펩타이드를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적 (예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 본 발명의 펩타이드는 원료에 대하여 15중량 % 이하, 바람직하게는 10 중량 % 이하의 양으로 첨가된다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0029] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0030] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 포함할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스, 수크로오스와 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml 당 일반적으로 약 0.01 내지 10 g, 바람직하게는 약 0.01 내지 0.1 g 이다.

[0031] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100중량부 당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0032]

[0033] 이하 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예 및 제조예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예 및 제조예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예 및 제조예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0034] **실시예 1. 방사무늬 김으로부터 단백질의 분리, 정제 및 동정**

[0035] 본 실험에 사용된 방사무늬 김(*Pyropia yezoensis*)은 전라남도 완도군에서 구입하여 재료로 사용하였다. 상기 방사무늬 김을 담수에 3회 수세한 후 동결 건조기를 이용하여 건조하였다. 건조된 김을 식품 분쇄기를 이용하여 미세한 분말형태로 분쇄하였다. 분쇄된 김 분말 40 g을 증류수 1 L와 함께 3 시간 동안 실온에서 추출하고, 감압하여 뷰후너 깔대기로 여과하였다. 상기 여과액에 3배 부피의 에탄올을 첨가하여 침전된 당을 제거하고 남은 상층액을 분리하여 감압농축하였다.

[0036] 그 후 상기 농축액을 최종 농도 80%가 되도록 암모늄 설페이트(ammonium sulfate)를 첨가한 후, 40 °C에서 24시간 교반하면서 단백질을 흡착시켰다. 상기 단백질이 흡착된 암모늄 설페이트를 탈이온수 20 mL로 녹인 후 동결 건조 하였다.

[0037] 동결건조된 시료 20 mg을 1 mL 증류수에 녹이고 15000×g로 10분 동안 원심분리하였다. 원심분리를 통해 얻은 상등액 5 μL를 취하여 Laemmli 완충용액(125 mM Tris-HCl, 4% SDS, 20% 글리세롤, 10% 2-메르캅토에탄올(2-mercaptoethanol), 0.002% 브로모페놀블루(bromophenol blue)와 동량으로 혼합한 후 95 °C에서 5분간 배양하였다. 상기 배양액을 18% 아크릴 아미아드 젤로 SDS-PAGE(Sodiumdodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 수행한 후, 쿠마시 브릴리언트 블루(Coomassie Brilliant Blue) G-250으로 염색하였으며, 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0038] 도 1에 나타난 바와 같이, 김 추출물로부터 분리된 단백질은 10kDa의 분자량을 가진 단일밴드로 확인되었다.

[0039] 또한, 상기 10 kDa 단백질 밴드를 채취하고 MALDI-QIT-TOF를 이용하여 연속적인 질량분석(Tandem mass spectrometry(MS/MS) 이온 분석을 수행하였으며, 그 결과를 표 1에 나타내었다.

표 1

Protein ID	m/z	Delta ^a , Da	Missed cleav. ^b	Score ^c	Sequence ^d	Accession no.			
						Rhod_EST ^e	Pye_CDS ^f	Swiss Prot	NCBI ^{nr}
PYP1	1687.96	0.08	0	40	QQAIHVAPSFADYLYK	AV429545	20922_g5127	NA ^g	NA ^h
	2197.09	0.09	1	20	SSGGGEATRDPEPT	AV429545	NA ^g	NA ^g	NA ^h
					AVDPNDPK				

[0040]

[0041] 또한, 도 1에 나타난 10 kDa 단백질 밴드를 채취하고 N 말단 아미노산 서열과 페닐치오하이드란토인-아미노산(phenylthiohydantoin-amino acid)를 단백질 시퀀서 PPSQ-33A(Shimadzu, Kyoto, Japan)로 분석하였으며, 상기 단백질 서열의 다중서열정렬(Multiple sequence alignment)을 도 2에 나타내었다.

[0042] 도 2에서 회색 글자는 염록체의 타겟 시그널 시퀀스로 추정되며, 밑줄친 서열은 실험에서 측정된 최종 단백질(mature protein)의 N 말단 단백질 서열을 나타낸다. 또한 형광표시가 되어 있는 서열은 MS/MS 이온 분석에 의한 트립신 분해 펩티드를 나타내고, 별, 콜론, 닥트는 동일한 아미노산, 대체된 형태, 반대체된 형태를 나타내며, C-말단 이후 최종 단백질의 동일한 정도와 유사성을 (I)와 (S)로 나타내었다.

[0043] 도 2에 나타난 바와 같이, 구조분석 결과 상기 단백질의 N-말단 펩타이드의 아미노산 서열은 Ala-Leu-Glu-Gly-Gly-Lys-Ser-Ser-Gly-Gly-Gly-Glu-Ala-Thr-Arg-Asp-Pro-Glu-Pro-Thr로 확인되었으며, 이를 PYP1(1-20)으로 명명하였다.

[0044] **실시예 2. 펩타이드 PYP1(1-20)의 합성**

[0045] 상기 실시예 1에서 김으로부터 분리한 단백질의 N-말단 펩타이드인 PYP1(1-20)을 합성하였다. 이의 정제는 Shimadzu Prominence HPLC(high performance liquid chromatography)를 사용하였으며, C18 컬럼(Shiseido capcell pak, shiseido, Tokyo, Japan)으로 0.1% TFA(trifluoroacetic acid)/water와 10-70% acetonitrile/in 0.1% TFA의 그라디언트(gradient)를 사용하여 유속 1.0 mL/분으로 조절하고 220 nm에서 자외선 검출을 실시하였으며, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

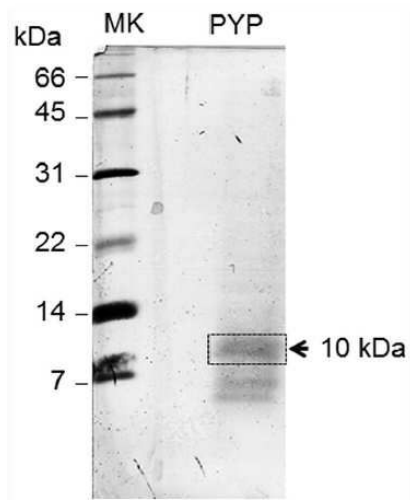
- [0046] 도 3에 나타난 바와 같이, 합성된 펩타이드 PYP1(1-20)의 분자량은 1,916 Da로 확인되었다.
- [0047] **실험예 1. 김으로부터 분리한 단백질 유래 펩타이드 PYP1(1-20)의 간 손상 저해 효과 실험**
- [0048] 상기 실시예 1에서 김으로부터 분리한 단백질의 N-말단 펩타이드인 PYP1(1-20)이 아세트아미노펜 유발성 간 손상에 미치는 효과를 정상 간세포(Chang living cell)을 이용하여 측정하였다.
- [0049] 정상 간세포는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)로부터 구입하였으며, MEM(Minimum essential medium) 배지에 항생제(페니실린/스트렙토마이신) 100 units/mL를 첨가하여 0.22 μ m 여과기로 여과한 후, 배양 전에 우태아혈청(Fetal bovin serum, FBS)을 최종농도가 10%가 되도록 첨가하여 사용하였으며, 세포는 37 $^{\circ}$ C의 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양중인 세포는 3일에 한번 배지를 교환하였다.
- [0050] 먼저, 상기 실시예 1에서 분리된 펩타이드 PYP1(1-20)이 세포증식에 미치는 영향 및 독성 유무를 측정하기 위하여, 정상 간세포를 96-well plate에 2×10^4 cells/mL의 농도로 100 μ L씩 분주하여 배양하였다. 24시간이 지난 후 무혈청 배지로 교환하고 다시 24시간 동안 배양하였다. 상기 펩타이드 PYP1(1-20)의 시료는 무혈청 배지에 용해한 후 희석하여 각각 0, 250, 500 ng/mL의 농도로 조정하여 각각의 간세포에 첨가하고 37 $^{\circ}$ C의 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 이를 CellTiter 96 aqueous non-radioactive cell proliferation assay(Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 MTS/phenazine methosulfate를 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양한 다음, 마이크로플레이트리더(MicroplateReader)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 그 결과를 도 4A에 나타내었다.
- [0051] 도 4A에 나타난 바와 같이, 펩타이드 PYP1(1-20)은 정상 간세포에서 세포내 독성을 일으키지 않으며, 오히려 세포의 성장을 돕는 것을 확인하였다.
- [0052] 또한, 아세트아미노펜의 세포증식 저해 효과 및 펩타이드 PYP1(1-20)의 손상 회복 효과를 측정하기 위하여, 정상 간세포를 96-well plate에 2×10^4 cells/mL의 농도로 100 μ L씩 분주하여 배양하였다. 24시간이 지난 후 무혈청 배지로 교환하고 무혈청 배지에 아세트아미노펜 단독, 아세트아미노펜 15mM + PYP1(1-20) 250 ng/mL, 아세트아미노펜 15 mM + PYP1(1-20) 500 ng/mL으로 처리하여 24시간 동안 37 $^{\circ}$ C의 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 이를 CellTiter 96 aqueous non-radioactive cell proliferation assay(Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 MTS/phenazine methosulfate를 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양한 다음, 마이크로플레이트리더(MicroplateReader)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 그 결과를 도 4B에 나타내었다.
- [0053] 도 4B에 나타난 바와 같이, 15 mM 아세트아미노펜을 첨가하여 24시간 동안 배양한 경우 세포수가 대조구에 비해 80%까지 유의하게 감소하였으나, 펩타이드 PYP1(1-20)의 첨가로 인해 38%까지 회복되는 것을 확인하였다.
- [0054] 이는 펩타이드 PYP1(1-20)이 아세트아미노펜에 의한 간세포 손상을 회복시키는 효과가 있음을 나타낸다.
- [0055] 이하 본 발명의 약학적 조성물과 식품 조성물의 제제예를 설명하나, 이는 본 발명을 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.
- [0056] **제제예 1. 약학적 제제**
- [0057] **1-1. 산제의 제조**
- | | | |
|--------|----------------|--------|
| [0058] | 단백질 PYP1(1-20) | 20mg |
| [0059] | 유당 | 100 mg |
| [0060] | 탈크 | 10 mg |
- [0061] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.
- [0062] **1-2. 정제의 제조**

[0063]	펩타이드 PYP1(1-20)	10 mg
[0064]	옥수수전분	100 mg
[0065]	유당	100 mg
[0066]	스테아린산 마그네슘	2 mg
[0067]	상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.	
[0068]	<u>1-3. 캡슐제의 제조</u>	
[0069]	펩타이드 PYP1(1-20)	10 mg
[0070]	결정성 셀룰로오스	3 mg
[0071]	락토오스	14.8 mg
[0072]	마그네슘 스테아레이트	0.2 mg
[0073]	상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.	
[0074]	<u>1-4. 주사제의 제조</u>	
[0075]	펩타이드 PYP1(1-20)	10 mg
[0076]	만니톨	180 mg
[0077]	주사용 멸균 증류수	2974 mg
[0078]	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	26 mg
[0079]	통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.	
[0080]	<u>1-5. 액제의 제조</u>	
[0081]	펩타이드 PYP1(1-20)	10 mg
[0082]	이성화당	10 g
[0083]	만니톨	5 g
[0084]	정제수	적량
[0085]	통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.	
[0086]	제제예 2. 식품 조성물의 제조	
[0087]	<u>2-1. 건강식품의 제조</u>	
[0088]	펩타이드 PYP1(1-20)	100 mg
[0089]	비타민 혼합물	적량
[0090]	비타민 A 아세테이트	70 g
[0091]	비타민 E	1.0 mg
[0092]	비타민 B1	0.13 mg

[0093]	비타민 B2	0.15 mg
[0094]	비타민 B6	0.5 mg
[0095]	비타민 B12	0.2 g
[0096]	비타민 C	10 mg
[0097]	비오틴	10 g
[0098]	니코틴산아미드	1.7 mg
[0099]	엽산	50 g
[0100]	판토텐산 칼슘	0.5 mg
[0101]	무기질 혼합물	적량
[0102]	황산제1철	1.75 mg
[0103]	산화아연	0.82 mg
[0104]	탄산마그네슘	25.3 mg
[0105]	제1인산칼륨	15 mg
[0106]	제2인산칼슘	55 mg
[0107]	구연산칼륨	90 mg
[0108]	탄산칼슘	100 mg
[0109]	염화마그네슘	24.8 mg
[0110]	상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.	
[0111]	2-2. 건강음료의 제조	
[0112]	펩타이드 PYP1(1-20)	100 mg
[0113]	비타민 C	15 g
[0114]	비타민 E(분말)	100 g
[0115]	젖산철	19.75 g
[0116]	산화아연	3.5 g
[0117]	니코틴산아미드	3.5 g
[0118]	비타민 A	0.2 g
[0119]	비타민 B1	0.25 g
[0120]	비타민 B2	0.3 g
[0121]	물	정량
[0122]	통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85 ℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 l 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.	
[0123]	상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.	

도면

도면1



도면2

A

→ mature protein

PYP1	MAFVS—GFTGMPVTARVS—KAVCRTRMALEGGKSSGGGEATRDPEPTAV
Ppu_hypo	MAFVS—VFTGLAVAARTP—VAVCRTRMALEGGKSSGGGEATRDPEPTAV
Ccr_hypo	MAFVPTTSFTGLRVRAAAPRVCHAPVRVAKWRMSEEG—KGFGGGEATRDPTPTTEI
Ehu_hypo	MFRFLLTALCLALASALMAPVAMPS—KVGVSVMSE—GGKGFGGGEATRDPEPTTEI
Ehu_FBPA1N	MILLPALALSSAFLAPHAASR—ALSTSKVAMN—GGKGFGGGEATRDPAPTVI

: : : : : * * * ***** ** :

PYP1	DPNDPKGKQQAIVAPSFADYLKAQA—DKKKAEGK	56 (81)	
Ppu_hypo	DPNDPKGKQQAIVAPSFADYLKAQA—EKKAAEGK	56 (81)	S: 98.2%, I: 96.4%
Ccr_hypo	DPNDPKGKQQAIVHAETFDYQARVAREKAKEAK	56 (89)	S: 74.1%, I: 60.3%
Ehu_hypo	DPNDPKGKQQAIVHAESFAEYLAKRQAS—	49 (83)	S: 70.2%, I: 66.7%
Ehu_FBPA1N	DPNDPKGKQQAIVHAESFAEYLAKRSAGGGAAPAA>>	55 (84)	S: 63.9%, I: 59.0%

*****:*** * :***:

B

PYP2	mdstafvgaaplrvaaaarsticmaAD—DKPVVSRRALTGAAAAALAAVAGSLP—ALA
Gja_PsbU	MAFISGPALPTARVNRTVAATPVRMASGEDTPVVSRRALLSSTLAAAAALLSAAAPAKA
Ccr_PsbU	MAFVTGPALPSLRAARATSTCTVRMAADAAEPVSRRAT IAGVVAAAAAALPKVA—NA
Cgr_PsbU	MKIAILATLFASAAAFAPSNPTTSATSTTALQAESGRREFFGALTAAAALAPVAA—NA

* : : : : * * : : : ** *

→ mature protein

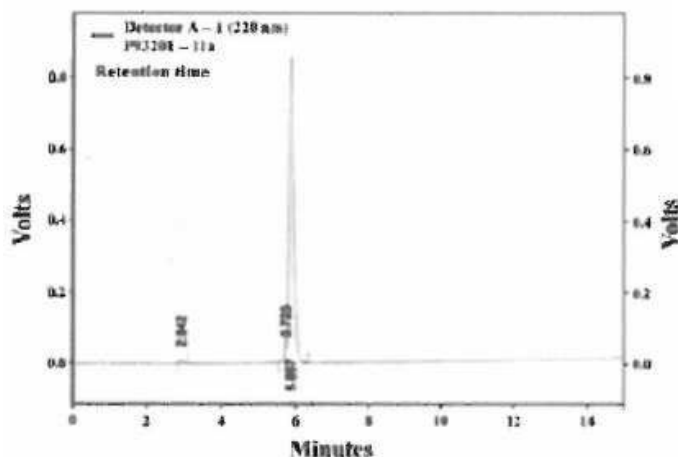
PYP2	ETETANVPFLGGSVIIDINNANVRAYAKYPGMYPTVAGLIATNGPFETVSDLYKIPGLTD
Gja_PsbU	DREYGNVGFLLGGDKIDVNNANVRVYGRLPGMYPYTLAGLIVANGPYKSVGDLYNIPGLDD
Ccr_PsbU	EREYPNVGFLLGGSDVIDVNNANVRAYVKFQGFYPTLAGLIVANGPYKSVDELFPDLTP
Cgr_PsbU	VIDYENIGYLLGGSSVIDINNANVRAYLKMPGMYPYTVAGKIVSHGPYSGVADLYKIPGLSS

[* *] [***] [*****] * [****] ** * [***] * [**] [**]

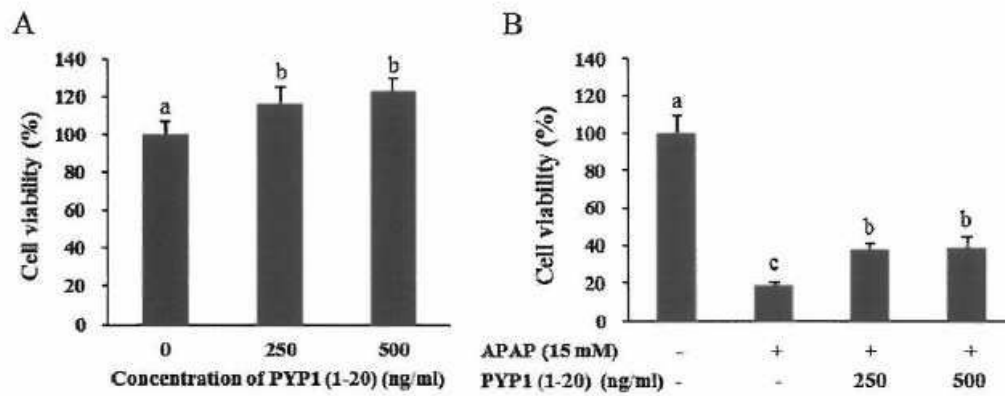
PYP2	LQIATLKKEYDKLVALTPTPEYELDKVNNGLYR	93 (151)
Gja_PsbU	KQTGLLKKEYDSFVALEPRPEYIDKFNNGLYR	93 (153) S: 75.3%, I: 66.7%
Ccr_PsbU	QMKTTLEKYKDNLTALEPTPEYELDKFNNGLYR	93 (151) S: 77.4%, I: 64.5%
Cgr_PsbU	AEADVKKYESRLTAKTPSPDYVIDRINNGLYR	93 (151) S: 78.5%, I: 60.2%

[***] [**] * * * * [**] *****

도면3



도면4



서열 목록

<110> Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation

<120> A composition for preventing and treating acetaminopheninducing
liver injury comprising the peptide derived from *Pyropia*
yezoensis

<130> 1-33

<160> 1

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> *Pyropia yezoensis*

<400> 1

Ala Leu Glu Gly Gly Lys Ser Ser Gly Gly Gly Glu Ala Thr Arg Asp

1 5 10 15

Pro Glu Pro Thr

20